

감미단백질 모넨린 발현 딸기 형질전환 식물체 개발

민성란 · 고석민 · 유재일 · 박지현 · 이소영 · 이인하 · 김현숙 · 김태일 · 최필선 · 정원중 · 김석원 · 김종현 · 유장렬

Development of transgenic strawberry plants expressing monellin, a sweet protein

Sung Ran Min · Suk Min Ko · Jae Il Lyu · Ji Hyun Park · So Young Yi · In-Ha Lee · Hyun Sook Kim · Tae Il Kim · Pil Son Choi · Won-Joong Jeong · Suk Weon Kim · Jonghyun Kim · Jang R. Liu

Received: 23 April 2015 / Revised: 29 May 2015 / Accepted: 2 July 2015
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Leaf discs from ‘Yeobong’ and ‘Maehyang’ strawberry plants were used as explants for transformation.

[†]These authors contributed equally to this work.

S. R. Min[†] · J. I. Lyu · J. H. Park · S. Y. Yi · W.-J. Jeong
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea)

S. M. Ko[†]
제주대 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea)

I.-H. Lee · H. S. Kim · T. I. Kim
충청남도농업기술원 논산딸기시험장
(Nonsan Strawberry Experiment Station, Chungcheongnam-do Agricultural Research & Extension Services, Nonsan 320-862, Korea)

P. S. Choi
남부대 한방제약개발학과
(Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Kwangju 506-706, Korea)

S. W. Kim
한국생명공학연구원 미생물자원센터
(Microbiological Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea)

J. Kim
한국기초과학지원연구원 생명과학연구부
(Division of Life Science, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-806, Korea)

J. R. Liu (✉)
대구경북과학기술원 뉴바이올로지 전공
(Dept. of New Biology, Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology, Daegu 711-873, Korea)
e-mail: liu@dgist.ac.kr

The *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harboring the monellin gene under the control of the CaMV 35S promoter was used in co-cultivation experiments. The frequencies of callus formation and plant regeneration from leaf explants after co-cultivation in ‘Yeobong’ were higher than those of ‘Maehyang’. These transgenic plants showed normal growth patterns and flowering. PCR and Southern hybridization confirmed that 1 to 2 copies of the monellin gene were integrated into genome of the transgenic strawberry plants. Northern blot analysis confirm that the transcripts were expressed in transgenic strawberry plants. Although long-term subcultured transgenic strawberry plants showed a phenomenon to escape the transgene, the transformation system established in this study provides new opportunities for genetic improvement of strawberry plants.

Keywords *Agrobacterium*-mediated transformation, Monellin, Strawberry, Sweet protein

서론

재배되고 있는 딸기는 8배체($2n=8x=56$)로 장미과에 속하는 경제적으로 중요한 과채류 작물이다. 2006년까지만 해도 ‘육보’, ‘장희’ 등 일본 도입 품종이 전체 딸기 재배 면적의 약 86%를 차지하였으나 그 뒤 국내 육성 품종인 ‘매향’, ‘설향’ 등이 개발·보급되어 2013년에는 국내품종 점유율이 80% 정도 차지하고 있다(Agricultural Outlook Center 2013).

딸기는 유전적으로 복잡하고 배수성이 높아 전통 육종

방법으로 형질을 개량하기가 용이하지 않다(Faedi et al. 2002; Marta et al. 2004). 1990년대부터 딸기 형질전환 연구가 시도되었는데 초기에는 주로 GUS와 같은 reporter 유전자 및 선발 마커 유전자를 2배체 또는 8배체 딸기로 도입하였고(Barcelo et al. 1998; El Mansouri et al. 1996; James et al. 1990; Nehra et al. 1990 a, b) 그 후 곰팡이, 바이러스 등 병 저항성(Graham et al. 1995; Vellicce et al. 2006), 내염성(Wang et al. 2004), 제초제 저항성(du Plessis et al. 1997; Morgan et al. 2002), 반결빙 단백질(Houde et al. 2004; Khammuang et al. 2005), taste-modifying 단백질 miraculin (Sugaya et al. 2008), 과실 무름방지(Jimenez-Bermudez et al. 2002) 및 딸기 AGPase small subunit cDNA antisense 발현 (Park et al. 2006) 등을 목적으로 다양한 유전자를 도입하여 새로운 딸기 품종개발을 위한 연구를 진행하여 왔다. 딸기에서 안정적이고 재현성 있는 형질전환 방법을 확립하기 위해서는 품종별 최적 호르몬 조합, 배양 방법 및 배양 절편 등이 포함된 고빈도 식물체 재분화 체계가 먼저 확립되어야 한다(Barcelo et al. 1998; Nehra and Stushnoff 1989). 본 연구팀에서는 안정적인 형질전환 방법을 확립하기 위하여 딸기 ‘여봉’ 품종에 대한 고빈도 식물체 재분화 시스템(Cho et al. 2005)을 확립한 바 있다.

본 연구에 사용된 유전자가 발현하는 감미단백질 모델린(monellin)은 서아프리카 식물 *Dioscorephyllum cucuminsii*의 열매에서 분리된 천연 식물성 단백질(Morris and Cagan 1972)로 44개의 아미노산으로 구성된 A chain과 50개의 아미노산으로 구성된 B chain으로 구성되어 있으며(Ota et al. 1999), 분자량 기준으로 sucrose보다 약 10만배 이상 단맛을 내는 특징을 갖는다(Edens and van der Wel 1985). 이 두 chain을 융합한 보다 안정적인 single-chain 모델린(Kim et al. 1989)을 식물의 핵이나 엽록체 계층에 도입하여 감미도 증가를 꾀하기도 하였다(Penarrubia et al. 1992; Roh et al. 2006).

따라서 본 연구에서는 외국 도입 품종 및 국내 육성 딸기 품종을 대상으로 CaMV 35S 프로모터 조절 하에 감미단백질 모델린 유전자가 재조합된 벡터가 들어있는 *Agrobacterium*을 매개로 형질전환을 수행함으로써 국내 육성 딸기 품종을 위한 형질전환 체계를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

외국 도입 국내 재배 품종인 ‘여봉’(*Fragaria × ananassa* Duch. ‘Yeobong’)과 국내 육성 품종인 ‘매향’(*Fragaria × ananassa* Duch. ‘Maehyang’) 딸기 식물체의 정단분열조직

유래 기내 식물체를 논산딸기시험장으로부터 분양 받아 1/2MS 배지에서 계대배양하여 증식시킨 다음, 계대배양 1-2개월된 각각의 식물체로부터 잎을 채취하여 그 절편체(약 5 × 7 mm)를 형질전환 재료로 사용하였다.

배지 조성

형질전환에 사용된 배지는 공동배양 배지, 캘러스 유도 배지, 식물체 재분화 배지 및 발근 배지로 구분하였으며 그 세부적 조성은 다음과 같다. 공동배양 배지는 Murashige & Skoog (MS, 1962) 무기염에 B5 (Gamborg et al. 1968) 비타민, 2.2 mg/L thidiazuron (TDZ), 0.3 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) 및 200 μM acetosyringone (AS)이 첨가되었고, 잎 절편체로부터 캘러스 유도 및 선발을 위해 공동배양 배지에 300 mg/L carbenicillin (Cb) + 50 mg/L kanamycin (Km), 캘러스로부터 식물체 재분화는 MS 무기염 + B5 비타민 + 3.0 mg/L 6-benzylaminopurin (BA) + 0.5 mg/L IBA + 300 mg/L Cb + 50 mg/L Km, 식물체로부터 뿌리유도를 위해서는 1/2MS + B5 비타민 + 300 mg/L Cb + 50 mg/L Km를 사용하였다. 모든 고체배지에 3% sucrose, 0.6% Phyto Agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands)가 첨가되었고 pH 5.6으로 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15 분간 고압 멸균 후 90 × 15 mm 플라스틱 페트리접시에 25 mL씩 분주하여 사용하였다.

***Agrobacterium*을 이용한 형질전환**

KpnI/BglII 제한효소로 처리한 pGA482 (An 1986) 벡터에 모델린 유전자를 재조합하여 pGA482-pS1D (Fig. 1) 벡터를 제작한 후 *Agrobacterium* EHA105로 형질전환 하였다. 형질전환 *Agrobacterium*의 단일 콜로니를 YEP (10 g/L bacto-trypton, 10 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl) + 100 mg/L rifampicin + 50 mg/L Km가 첨가된 10 mL의 액체배지에서 2일 동안 배양한 *Agrobacterium* 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 상등액은 버리고 액체공동 배양배지 10 mL로 O.D₆₀₀ 0.6-0.8이 되도록 현탁하였다. 여기에 200 μM이 되도록 AS를 첨가한 후 딸기 잎 절편체를 넣어 20분간 가끔씩 흔들어 주면서 접종하였다. 잎 절편체에 묻은 접종액을 여과지로 제거하고 공동배양 배지에 잎 절편의

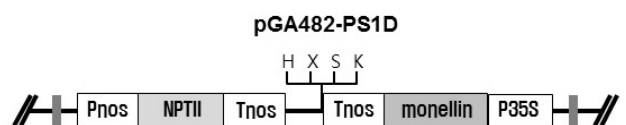


Fig. 1 Plant transformation vector (pGA482-pS1D). Pnos and Tnos, nopaline synthase promoter and terminator sequences, respectively; NPTII, neomycin phosphotransferase; P35S, CaMV 35S promoter; H, *HindIII*; X, *XbaI*; S, *SstI*; K, *KpnI*

잎면이 닿게 치상한 후 25°C, 암 조건에서 2-3일간 공동 배양 하였다. 공동배양 후 절편체를 멸균증류수로 3회 세척한 후 물기를 제거하고 300 mg/L Cb + 50 mg/L Km이 첨가된 선발을 겸한 캘러스 유도배지에 치상하여 25°C, 암조건에서 캘러스 형성 정도에 따라 2-4주 동안 배양하였다. 이후 동일배지에 계대배양 한 후 25°C, 16시간 광조건(70 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)에서 3주마다 계대배양 하였고, 배양 2개월후 잎 절편체에서 형성된 캘러스를 분리하여 계대배양을 계속하였다. 배양 후 약 5개월째에 선발배지에서 형성된 캘러스로부터 부정아가 발생하기 시작하면 식물체 재분화 배지로 옮겨 소식물체로 생육시켰고, 발근배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다. 뿌리가 유도된 식물체는 순화과정을 거친 후 온실에서 생육시키면서 다수의 자묘(daughter plant)를 발생시킨 후 화아분화를 위해 야냉처리(자묘가 심어져 있는 포트를 오후 6시부터 다음날 오전 8시까지 14시간 동안 15°C 저온상에 암 상태로 넣었다가 낮 동안에는 50% 차광 비가림 하우스에서 관리하는 방법으로 15-20일 동안 처리하여 화아분화 유도)를 거쳐 LMO 격리하우스에 정식하였다.

형질전환 식물체 분석

선발과정을 거친 순화된 식물체의 잎에서 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 프로토콜에 따라 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 모델린 특이적 primer (Forward: GGG-AATGGGAAATTATCGAT, Reverse: CTATTATGGTGGTG-GAACTGG)와 *nptII* 특이적 primer (Forward: GAGGCTATTCGGCTATGACTG, Reverse: ATCGGGAGCGGCGATACCGTA)이다. PCR로 유전자 도입이 확인된 딸기 형질전환체의 genomic Southern 분석을 위해 약 30 μg DNA를 *Xba* I 제한효소를 처리하여 0.7% agarose gel에 전기영동한 후 10X SSC 용액에서 capillary transfer 방법(Southern 1975)으로 Zeta-Probe GT blotting membrane (Bio-Rad, USA)에 전이시켰다. Membrane은 처리(1 M Na_2HPO_4 , 1 M NaH_2PO_4 , 7% SDS, 1 mM Na_2EDTA)용액에 약 2시간 동안 65°C에서 처리한 다음 [α - ^{32}P]dCTP로 표지된 모델린 유전자의 PCR 산물을 첨가하여 약 16시간 hybridization하였다. 반응을 마친 membrane은 1차 세척 용액(1 M Na_2HPO_4 , 1 M NaH_2PO_4 , 5% SDS, 1 mM Na_2EDTA)에서 10분 동안 세척하고 2차 용액(1 M Na_2HPO_4 , 1 M NaH_2PO_4 , 1% SDS, 1 mM Na_2EDTA) 용액에서 10분 동안 세척한 후 BAS-2500 Image plate (FujiFilm, Japan)에 노출시켰다. 또한, 유전자 발현을 분석하기 위해 형질전환 딸기 잎 1g을 2% CTAB, 2% PVP (K-30), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.5 g/L spermidine, 2% β -mercaptoethanol이 포함된 RNA 추출 버퍼와 LiCl를 사용하여 total RNA를 추출

하였다. Total RNA를 1% agarose-formaldehyde gel로 전기영동한 후 Zeta-Probe GT blotting membrane (Bio-Rad, USA)으로 전이시켰다. Prehybridization 및 hybridization 과정은 Southern 분석과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰

딸기 형질전환체 생산

기내 배양 중인 딸기 ‘여봉’ 및 ‘매향’ 잎 절편체에 모델린 유전자 도입 pGA482-pS1D 벡터(Fig. 1)가 함유된 *Agrobacterium* EHA105을 매개로 딸기 형질전환을 수행하였다. 딸기 잎 절편체를 항생제가 함유되지 않은 공동배양 배지에서 2-3일간 공동배양 후 300 mg/L Cb, 50 mg/L Km이 첨가된 캘러스 선발배지에 옮겨 2-4주 동안 암 조건에서 배양하였다. 배양 2-4주후 형성된 캘러스를 광조건으로 옮겨 주었을 때 부분적으로 적색의 안토시아닌 색소가 함유된 녹색의 단단한 캘러스가 선발배지에서 형성되기 시작하였으며, 배양 1-2개월 후에 항생제에 내성을 보이는 녹색의 캘러스를 잎 절편체로부터 분리하여 계대배양 하면서 캘러스를 증식하였다(Fig. 2A). 계대배양 5개월 후 선발배지에서 증식된 캘러스에서 부정아가 발생하기 시작하면 식물체 재분화 배지로 옮겨 소식물체로 발달을 유도하였다(Fig. 2B). 정상적인 소식물체를 분리하여 발근배지로 옮겨 뿌리 발달을 유도하였고(Fig. 2C), 온실에서의 순화과정(Fig. 2D)을 거쳐 포복경을 증식시킨 후 자묘의 화아분화를 위해 야냉처리를 실시한 후 LMO 격리포장에 정식하여 재배하였으며(Fig. 2E), 이 후 두 품종 모두 정상적으로 개화하였다(Fig. 3).

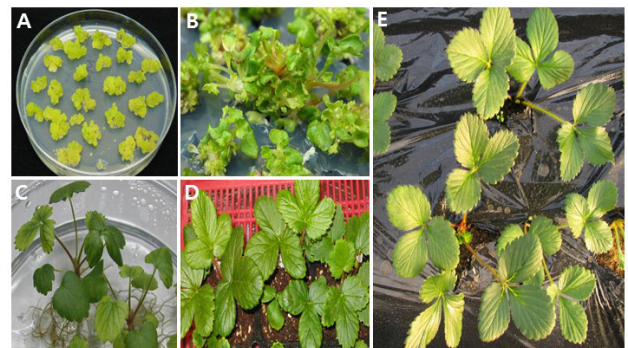


Fig. 2 Development of transgenic ‘Maehyang’ strawberry plants after *Agrobacterium* co-cultivation with pGA482-pS1D vector. (A) Proliferation of green calluses on selection medium with 50 mg/L kanamycin. (B) Plantlets developed from green calluses. (C) Rooted plants. (D) Acclimatized plants in potting soil. (E) Transgenic daughter plants transplanted to soil in the greenhouse

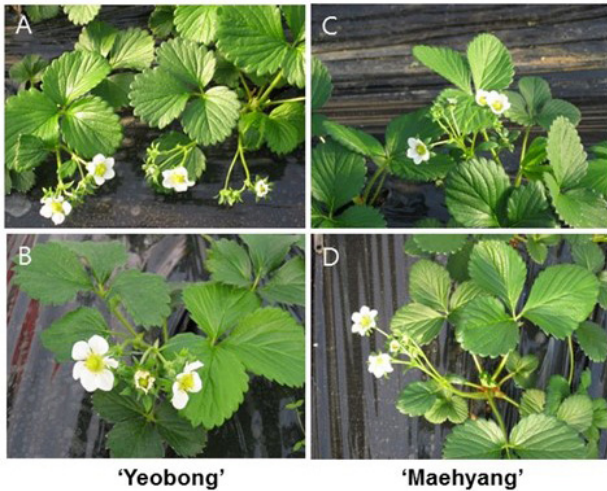


Fig. 3 Flowering of transgenic strawberry plants. (A and B) Wild type and transgenic plants of 'Yeobong'. (C and D) Wild type and transgenic plants of 'Maehyang'

딸기 형질전환체 분석

선발과정을 거쳐 순화된 딸기 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 모넨린 특이 염기서열 primer와 선발마커로 사용된 *npII* primer를 이용하여 PCR로 분석하였다. 그 결과 대부분 형질전환 식물체에서는 약 300 bp 크기에서 모넨린 유전자의 단편이 증폭되었고(Fig. 4A), 선발마커로 사용된 *npII* 유전자의 경우는 약 700 bp 크기의 밴드가 보였으나(Fig. 4B), 형질전환 시키지 않은 식물체에서는 밴드가 전혀 보이지 않았다(Fig. 4). PCR로 유전자 도입이 확인된 딸기 잎에서 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 형질전환된 '여봉' 및 '매향' 식물체에서 모넨린 유전자가 각각 1-2 카피 도입된 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 이와 같은 결과는 antimicrobial peptide-D gene (*APD*) 유전자가 도입된 6개의 'Toyonoka' 품종의 형질전환체의 경우 1 copy 도입 3개체, 2 copy 도입 1개체, 5 copy 이상 도입 2개체를 얻었다는 결과와 유사하였다(Qin and Zhang 2007). 한편, 형질전환 딸기 식물체로부터 도입유전자의 발현을 확인하기 위하여 잎에서 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 수행하였다. 그 결과 형질전환된 딸기 식물체에서는 두 품종 모두 모넨린 유전자가 발현되었으나 형질전환 되지 않은 대조구에서는 전혀 유전자가 전사되지 않았다(Fig. 6).

본 연구팀은 모넨린 유전자 이외에도 면역단백질 락토페린과 트레할로스 합성 TPSP 유전자가 도입된 매향 딸기 형질전환체를 확보하고 있다. 딸기 형질전환 식물체를 기내(1/2MS + B5 비타민 + 25 mg/L Km)에서 3개월에 한번씩 장기간(약 5년간) 계대배양을 통해 유지한 후, PCR로 도입유전자의 유지여부를 확인하였던 바 모넨린이 들어있는 형질전환체에서는 유전자가 대부분 escape

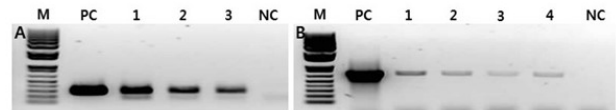


Fig. 4 PCR analysis of 'Maehyang' strawberry plants. (A) Monellin specific primer. (B) NPTII specific primer. PC, Positive control; 1-4, Putative transgenic plants; NC, Non-transgenic control plant

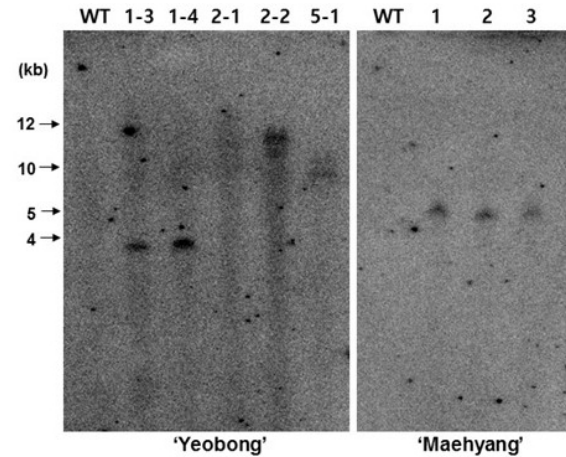


Fig. 5 Southern blot analysis of transgenic strawberry plants. WT, Non-transgenic control plant; 1-3 ~ 5-1 and 1 ~ 3, transgenic 'Yeobong' and 'Maehyang' transgenic plants, respectively

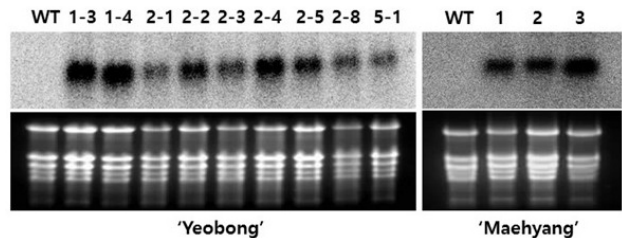


Fig. 6 Northern blot analysis of transgenic strawberry plants. WT, Non-transgenic control plant; 1-3 ~ 5-1 and 1 ~ 3, 'Yeobong' and 'Maehyang' transgenic plants, respectively. Low panel was EtBr-stained RNA gel

되는 현상을 보였으나, TPSP 및 락토페린이 들어 있는 형질전환체의 경우는 같은 조건에서도 유전자의 escape 이 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다(데이터 미제시). 이러한 원인은 8배체의 복잡한 유전성을 가지는 딸기 계놈에 모넨린 유전자가 불안정한 site에 도입되었다가 선발 항생제의 농도가 다소 낮은 배지에서의 장기간 계대 배양으로 인한 유전자의 소실로 추정되며, 추후 TPSP 및 락토페린이 도입된 딸기 형질전환체에서도 그와 같은 경향이 있는지 추적 관찰 및 원인 분석이 필요할 것이다.

본 연구에서 확립된 딸기 형질전환 체계는 향후 다양한 유용유전자를 국내 육성 딸기 품종에 안정적으로 도입할 수 있도록 도움을 줌으로써 우수 신품종 개발에 기여할 수 있을 것이다.

적 요

‘여봉’과 ‘매향’ 딸기 식물체로부터 잎 절편을 형질전환 재료로 이용하였다. CaMV 35S promoter에 모넨린 유전자가 연결된 pGA482-pS1D 벡터가 들어있는 아그로박테리움 EHA105 균주를 매개로 형질전환을 수행하였다. 공동 배양 후 잎 절편체로부터 캘러스 형성과 식물체 재분화율은 ‘여봉’ 품종이 ‘매향’ 품종보다 높았으며 이들 형질전환 식물체는 정상적으로 생육하여 개화하였다. PCR 및 Southern blot 분석을 통해 1-2 카피의 모넨린 유전자가 형질전환 딸기 식물체에 도입되었음을 확인하였으며, Northern blot 분석을 통하여 두 품종에서 모두 모넨린 유전자가 발현됨을 확인하였다. 비록 장기간 계대배양된 이들 딸기 형질전환 식물체에서는 모넨린 유전자가 escape 되는 경향을 보였지만, 본 연구에서 확립된 형질전환 시스템은 딸기의 유전적 개량을 위한 새로운 기회를 제공할 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 한국생명공학연구원 주요사업(KRIBB Research Initiative Program)과 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업(원예종자사업단, 과제번호: 2013003-04-3-WTD21)의 지원으로 수행되었다.

References

- Agricultural Outlook Center (2013) Fruit Vegetables – Strawberry. Korea Rural Economic Institute (KREI), Korea
- An G (1986) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. *Plant Physiol* 81:86-91
- Barcelo M, El-Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, Pliego F (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54:29-36
- Cho MA, Choi KM, Ko SM, Min SR, Chung H-J, Liu JR, Choi PS (2005) High frequency plant regeneration from leaf explant cultures of domestic cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). *J Plant Biotechnol* 32:175-179
- Du Plessis HJ, Brand RJ, Glyn-Woods C, Goedhart MA (1997) Efficient genetic transformation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivar Selekt. *Acta Hort* 447:289-294
- Edens L, van der Wel H (1985) Microbial synthesis of the sweet tasting plant protein thaumatin. *Trends Biotechnol* 3:61-64
- El Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, Lopez-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Quesada MA (1996) Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. *Plant Cell Rep* 15:642-646
- Faedi W, Mourgues F, Rosati C (2002) Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. *Acta Hort* 567:51-59
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:15-158
- Graham J, McNicol RJ, Grieg K (1995) Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor gene. *Ann Appl Biol* 127:163-173.
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ (1990) *Agrobacterium* mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) using disarmed binary vectors. *Plant Sci* 69:79-94
- Jimenez-Bermudez S, Redondo-Nevaldo J, Munoz-Blanco J, Caallero JL, Lopez-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128:751-759
- Houde M, Dallaire S, N'Dong D, Sarhan F (2004) Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol J* 2:381-387
- Khammuang S, Dheeranupattana, Hanmuangjai P, Won-groung S (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of modified antifreeze protein gene in strawberry. *Songklanakarin J Sci Technol* 27:693-703
- Kim SH, Kang CH, Kim R, Cho JM, Lee YB, Lee TK (1989) Redesigning a sweet protein: Increased stability and renaturability. *Protein Eng* 2:571-575
- Marta AE, Camadro EL, Diaz-Ricci JC, Castagnaro AP (2004) Breeding barriers between the cultivated strawberry, *Fragaria × ananassa*, and related wild germplasm. *Euphytica* 136:139-150
- Morgan A, Baker CM, Chu JSF, Lee K, Crandall BA, Jose L (2002) Production of herbicide tolerant strawberry through genetic engineering. *Acta Hort* 567:113-115
- Morris JA, Cagan RH (1972) Purification of monellin, the sweet principal of *Dioscoreophyllum cumminsii*. *Biochim Biophys Acta* 261:114-122
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL, Stushnoff C (1990a) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* 9:293-298
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL, Stushnoff C (1990b) *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 9: 10-13
- Nehra NS, Stushnoff C (1989) Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Amer Soc Hort Sci* 114:1014-1018
- Ota M, Sawa A, Nio N, Ariyoshi Y (1999) Enzymatic ligation for synthesis of single chain analogue of monellin by transglutaminase. *Biopolymers* 50:193-200

- Park J-I, Lee Y-K, Chung W-I, Lee I-H, Choi J-H, Lee W-M, Ezura H, Lee S-P, Kim I-J (2006) Modification of sugar composition in strawberry fruit by antisense suppression of an ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol Breeding* 17:269-279
- Penarrubia L, Kim R, Giovannoni J, Kim S-H, Fisher RL (1992) Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Biotechnology* 10:561-564
- Qin YH, Zhang SL (2007) Factors influencing the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in strawberry cultivar Toyonoka. *J Nucl Agric Sci* 21:461-465
- Roh KH, Shin KS, Lee YH, Seo SC, Park HG, Daniell H, Lee SB (2006) Accumulation of sweet protein monellin is regulated by the *psbA* 5'UTR in tobacco chloroplasts. *J Plant Biol* 49:34-43
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517
- Sugaya T, Yano M, Sun H-J, Hirai T, Ezura H (2008) Transgenic strawberry expressing the taste-modifying protein miraculin. *Plant Biotechnol* 25:329-333
- Vellicce GR, Ricci JCD, Hernandez L, Castagnaro AP (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. *Transgenic Res* 15:57-68
- Wang JL, Ge HB, Peng SQ, Zhang HM, Chen PL, Xu JR (2004) Transformation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) with late embryogenesis abundant protein gene. *J Horticult Sci Biotechnol* 79:735-738